

TIDIGA EFFEKTER AV JONISERANDE STRÅLNING

En radiobiologisk och radiofysiologisk studie på cilieceller
in vitro

av

LARS BALDETORP



Lund 1977

TIDIGA EFFEKTER AV JONISERANDE STRÅLNING

En radiobiologisk och radiofysiologisk studie på cilieceller
in vitro

av

LARS BALDETORP

Med. lic., Ssk.

AKADEMISK AVHANDLING

som med vederbörligt tillstånd av Medicinska Fakulteten vid
Universitetet i Lund för avläggande av medicine doktorsexamen
kommer att offentligen försvaras i Onkologiska klinikens föreläsningssal, Lasarettet i Lund, torsdagen den 28 april 1977 kl. 9.15

LUND 1977

Från Onkologiska kliniken, Lunds Universitet, Lund, Sverige

TIDIGA EFFEKTER AV JONISERANDE STRÅLNING

En radiobiologisk och radiofysiologisk studie på cilieceller
in vitro

av

LARS BALDETORP



Lund 1977



Berlingska Boktryckeriet, Lund 1977

Till
Ingrid, Mats och Jan

Föreliggande arbete grundar sig på nedanstående skrifter:

- I. Effects of ionizing radiation on the activity of the ciliated epithelium of the trachea.
I samarbete med Daniel Huberman, Carl Håkan Håkansson och Nils Gunnar Toremalm.
Acta Radiologica, Ther. Phys. Biol. 15 (1976), 225.
- II. Influence of temperature on the activity of ciliated cells during exposure to ionizing radiation.
I samarbete med Carl Håkan Håkansson och Bo Baldetorp.
Acta Radiologica, Ther. Phys. Biol. Under tryckning.
- III. Ultrastructural alterations in ciliary cells exposed to ionizing radiation. A scanning and transmission electron microscopic study.
I samarbete med Claes von Mecklenburg och Carl Håkan Håkansson.
Cell and Tissue Research. Under tryckning.
- IV. Effect of 50 kV x-rays and Cobalt-60 gamma-rays on the activity of ciliated cells.
Acta Radiologica, Ther. Phys. Biol. Under tryckning.
- V. Response of ciliated cells during irradiation at different dose rates.
I samarbete med Carl Håkan Håkansson.
Acta Radiologica, Ther. Phys. Biol. Under tryckning.

I texten betecknas dessa skrifter med ovan angivna romerska siffror.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Förord	7
Introduktion	9
Målsättning	11
Material och Metodik	13
Resultat	14
Initiala effekter av den joniserande strålningen	14
Morfologiska förändringar efter bestrålning	14
Temperaturens inverkan på tidiga stråleffekter	15
Fotonenergins betydelse för tidiga stråleffekter	15
Doshastighetens betydelse för tidiga stråleffekter ...	16
Diskussion	17
Sammanfattning	25
Översiktstabell	27
Litteraturförteckning	29

Förord

Det föreliggande arbetet har möjliggjorts genom ekonomiskt stöd från Konung Gustaf V:s Jubileumsfond, John och Augusta Perssons Stiftelse, B. Kamprads fond, Medicinska Fakulteten vid Lunds Universitet samt Statens Medicinska Forskningsråd (projekt nr. B75-17X-3897-03A och B77-17X-03897-05).

Ett varmt tack vill jag framföra till professor Martin Lindgren för all den ovärderliga hjälp, förståelse och vänliga uppmuntran som kommit mig till del under arbetets tillkomst. Docent Carl Håkan Håkansson och docent Nils Gunnar Toremalm vill jag hjärtligt tacka för entusiasmerande handledning, konstruktiv kritik och givande samarbete. Docent Bertil Persson och fil.dr. Claes von Mecklenburg tackar jag för stimulerande diskussioner och värdefulla råd. Civilingenjör Bo Baldetorp, fil.kand. Daniel Huberman och fil.stud. Henrik Thoremalm tackas för skickligt laboratoriearbete. Ett stort tack riktas till laboratorieassistenterna Marianne Palmegren och Eva Henriksson för utmärkt arbete med manuskripten, och till Kenneth Muir för översättning och språkgranskning.

Lund i mars 1977

Lars Baldetorp

Introduktion

Radiobiologi omfattar studier av de effekter som joniserande strålning utlöser i levande organismer. Den radiobiologiska forskningens mål är att kartlägga händelseförloppen i en cell, en vävnad eller i en individ från energiabsorptionen under bestrålningen till den definitivt sista fasen i skeendet, nämligen det bestrålade objektets död. Vissa avsnitt i denna kedja av fysiologiska och biokemiska effekter har genom omfattande forskning kunnat beskrivas i detalj. Exempel på detta är radiolys av vatten och organiska ämnen. Andra avsnitt är däremot inte i samma utsträckning utforskade. Detta gäller framför allt de fysiologiska processerna i tidiga skeden av en bestrålning. Anledningen härtil är bland annat att lämpliga undersökningsmetoder saknats. Emellertid har radiobiologin under de senaste åren genom tillkomsten av allt mer avancerade kemiska och fysikaliska analysmetoder och förbättrad cellodlingsteknik, kunnat tränga allt djupare in i den problematik som är förknippad med de första sekunderna av den joniserande strålningens inverkan på levande material.

Många olika biologiska material har kommit till användning i radiobiologiska försök. Sålunda har man å ena sidan använt olika species inom djurvärlden såsom råttor, möss, marsvin etc. för totalkroppsbestrålningar, medan man å andra sidan benyttat sig av celler, enstaka eller i kultur, benigna eller maligna, och olika encelliga organismer, till exempel bakterier, för högdosbestrålning. Värde av att använda dylika material i biologiska testsystem är stort och betydelsefull information har erhållits. Det begränsas dock av att en del parametrar ej alltid kan hållas konstanta under försöken. Exempel på sådana parametrar är temperatur och syrgastension. Därtill kommer också faktorer vars betydelse ej alltid kan bedömas, vilka tillsammans med de ovan exemplifierade i betydande grad kan påverka ett radiobiologiskt försök.

Hitintills har ett fåtal undersökningar angående effekterna av joniserande strålning grundats på observationer av strålinducerade förändringar i den fysiologiska aktiviteten hos enstaka celler eller cellförband. Efter en omfattande grundforskning rörande trakealepitelets morfologi och fysiologi hos framför allt kanin, har den radiobiologiska forskningen tillförts ett biologiskt testsystem som är särskilt lämpligt för analys av tidiga stråleffekter in vitro.

Genom att utnyttja en förut välutvecklad metod för registrering av mukociliär aktivitet, har det varit möjligt att på trakealepitel från kanin, bedriva undersökningar rörande tidiga effekter av joniserande strålning samt att analysera inverkan av sådana parametrar som är av intresse för den kliniska radioterapien.

Målsättning

Såsom ett led i den radiobiologiska grundforskningen har föreliggande avhandlingsarbete inriktats på undersökning av initiala effekter av joniserande strålning genom att registrera förändringar i den fysiologiska aktiviteten hos bestrålade celler i ett biologiskt testsystem vars egenskaper genom tidigare forskning väl kartlagts. Därtill har intentionen varit att i samma testsystem undersöka betydelsen av de parametrar som har anknytning till den kliniska verksamheten. Problemställningen kan sålunda sammanfattas i följande punkter:

- Att vidareutveckla en metod för registrering av fysiologisk aktivitet simultant med bestrålning (I.).
- Att undersöka hur och inom vilken tid efter inledd exponering den joniserande strålningen påverkar cellernas fysiologiska aktivitet (I.).
- Att korrelera de fysiologiska fynden under bestrålning till morfologiska förändringar på subcellulär nivå (III.).
- Att undersöka temperaturens inverkan på tidiga effekter av joniserande strålning (II.).
- Att undersöka hur fotonenergin påverkar stråleffekterna initialt (IV.).
- Att undersöka hur doshastigheten inverkar på de tidiga biologiska effekterna under bestrålning (V.).

Material och Metodik

Samtliga undersökningar utfördes på trakealslemhinna från kanin. Totalt användes trakea från 160 djur. Alla försöksdjur var fullvuxna och företedde ej tecken på luftvägsinfektion eller andra sjukdomar. För undvikande av eventuella effekter på trakealepitelet genom bruk av anestesimedel, avlivades djuren med ett slag i nacken. Därefter framdissekerades trakea skyndsamt och placerades i en försökskammare som tidigare i detalj beskrivits (I.).

För registrering av den mukociliära aktiviteten användes en ljusreflexmetod som ursprungligen utarbetats av HÅKANSSON & TOREMALM (1965) och som senare vidareutvecklats (MERCCKE et coll. 1974, TOREMALM et coll. 1974). Denna metodik anpassades till simultan bestrålning med en Philips närbestrålningsapparat och en Siemens Gammatron III. För detaljerade data rörande bestrålningen, hänvisas till tidigare arbeten (IV., V.). Upprepade kontrollmätningar av givna doser visade god reproducerbarhet och avvikelserna från de beräknade doshastigheterna var maximalt 2,7 %.

Material för den morfologiska undersökningen togs från mellersta delen av de bestrålade trakealpreparaten inom 30 sekunder efter 10 Gy till 70 Gy samt efter 90, 150 och 330 sekunder. Materialet behandlades före elektronmikroskoperingen enligt en metodik som tidigare angivits (III.).

Ett referensvärde för den mukociliära frekvensen bestämdes för varje preparat. Det angavs som ett medelvärde av antalet vågrörelser per sekund i slemhinneytan under 30 sekunder omedelbart före bestrålningen. Resultaten redovisades sekundvis under pågående bestrålning som medelvärden av den procentuella avvikelsen av vågrörelsefrekvensen från referensvärdena i 20 undersökta preparat för varje experiment. Dessutom angavs medelvärden för vågrörelsefrekvensen var femte sekund under exponeringarna. Dessa baserades på de ovan nämnda sekundmedelvärdena under konsekutiva perioder om tio sekunder. Sekundmedelvärdena låg också till grund för samtliga de kurvor som utarbetats med hjälp av datamaskin. För beräkning av de av dessa kurvor beskrivna ytor, användes Simpsons formel (II.).

Bearbetningen av resultaten skedde i samråd med statistisk expertis från Lunds Universitet.

Resultat

Vid bestrålning med Philips närbestrålningsapparat kunde störningsfri registrering av vågrörelsefrekvensen i trakealpreparaten ske kontinuerligt såväl före som under och efter exponeringarna. Vid coboltbestrålningarna kunde registrering ske före och under exponeringarna. På grund av mekaniska störningar från coboltapparatsens bländarsystem under exponeringens slutsekund, kunde som regel ingen nöjaktig registrering av den mukociliära aktiviteten ske efter avslutad bestrålning. Temperatur och fuktighet i försökskammaren kunde hållas konstant vid önskade nivåer under försöken.

INITIALA EFFEKTER AV DEN JONISERANDE STRÅLNINGEN (I.):

Karakteristiskt för samtliga försök var att en ökning av den mukociliära aktiviteten alltid kunde registreras. Tidpunkten vid vilken denna inträffade, dess storlek och duration varierade (Tabell 1.). Vid en doshastighet av 0,34 Gy per sekund visade den mukociliära aktiviteten en klar ökning inom loppet av exponeringens första fem sekunder. Den maximala ökningen sågs inom 10 till 15 sekunder efter inledd bestrålning. Det fortsatta förloppet under bestrålningen karakteriserades av en gradvis reduktion av den mukociliära aktivitetsökningen (I.). Vid rebestrålning av preparaten efter två timmar kunde det ovan beskrivna händelseförloppet ej reproduceras, utan en tendens till reduktion av den mukociliära aktiviteten kunde förmärkas under hela exponeringen (BALDETORP, to be published). Som kontroll bestrålades trakealpreparat efter två timmars vistelse i försökskammaren. Dessa visade en frekvensökning på förväntad tid i motsats till de rebestrålade (Tabell 1.).

MORFOLOGISKA FÖRÄNDRINGAR EFTER BESTRÅLNING (III.):

Förändringar i mitokondriemembranernas struktur kunde påvisas med transmissionselektronmikroskopi efter bestrålning till 30 Gy. Någon accentuering av membranskadorna kunde ej spåras med den använda tekniken efter högre stråldoser (maximalt 70 Gy). En koncentrerad av mitokondrierna till ciliecellernas apikala del var mera påtaglig efter bestrålning. Ställvis sågs mitokondrier ligga i direkt kontakt med ciliernas basalkroppar. Mitokondriernas form påverkades inte av bestrålningen.

Med svepelektronmikroskopi visualiserades cilieförändringar efter be-

strålning till 40 Gy. Dessa bestod dels av oregelbundenhet i ciliernas orientering dels av blåsbildningar under ciliemembranen speciellt apikalt. Sammansinträng av cilietopparna förekom inom vissa områden. Förändringarna accentuerades ej efter högre stråldoser. Ciliernas storlek påverkades ej. Efter bestrålning kunde ett större antal gobletceller iakttas per synfält jämfört med kontrollmaterialet.

TEMPERATURENS INVERKAN PÅ TIDIGA STRÅLEFFEKTER (II.):

Undersökningarna utfördes vid följande temperaturer: 20° C, 30° C, 37° C och 40° C. Vid samtliga temperaturnivåer förekom en snabbt insättande ökning av den mukociliära aktiviteten. Medelvärden av den procentuella ökningen redovisas i tabellform för var femte sekund under exponeringarna (Tabell 1.). Resultaten karakteriserades av att frekvensökningen genomgående var större vid 20° C och 30° C än vid 37° C och 40° C (II., Figur 1.). De beräknade k-värdena för tidsintervallerna 0 - 10 sekunder och 10 - 20 sekunder efter inledd bestrålning, var högst vid de två lägre temperaturerna. Den absolut maximala frekvensökningen inträffade för 20° C, 30° C och 40° C vid ungefär samma ackumulerade dos (omkring 3,5 Gy) medan den för 37° C inträffade efter 4,4 Gy (II., Tabell 2.). Storleken på de ytor som begränsades av de databearbetade kurvorna, bestämdes med Simpsons formel. Ytstorleken visade sig vara störst vid 20° C och 30° C och markant mindre och ungefär lika vid 37° C och 40° C (II., Figur 3.).

FOTONENERGINS BETYDELSE FÖR TIDIGA STRÅLEFFEKTER (IV.):

Två olika strålkvaliteter undersöktes nämligen röntgenstrålning genererad vid 50 kV (dosshastighet 0,05 Gy/s) och gammastrålning från ⁶⁰Co (dosshastighet 0,07 Gy/s). Under röntgenbestrålningen ökade den mukociliära aktiviteten inom fem sekunder med omkring 5 % och förhöll sig oförändrad under exponeringens första 25 sekunder. Vid denna tidpunkt inträffade en kraftig ökning av vågrörelsefrekvensen till maximalt 24,6 % (SD $\pm 8,2$) 32 sekunder efter exponeringens början varefter ökningen gradvis minskade under resten av bestrålningen (IV., Figur 1.).

Under ⁶⁰Co-bestrålningen erhöles en ökning av den mukociliära aktiviteten som var starkt avvikande från den vid röntgenbestrålningen. Sålunda ökade aktiviteten snabbt efter exponeringens början med 15,8 % (SD $\pm 12,7$) vid fem sekunder. Maximal ökning uppnåddes efter 16 sekunder och uppgick till 23,6 % (SD $\pm 17,0$) (IV., Figur 2.). Under resterande exponeringstid reducerades den mukociliära aktivitetsökningen betydligt mindre än under röntgenbestrålningen (Tabell 1.). Ytberäkningarna med Simpsons formel visade en i det närmaste dubbelt så stor yta för ⁶⁰Co som för röntgenstrål-

ningen (IV., Tabell 4.). Med utgångspunkt från de erhållna resultaten kunde den radiobiologiska effektiviteten (RBE) bestämmas för röntgenstrålning genererad vid 50 kV i förhållande till ^{60}Co baserat på olika biologiska kriterier (IV., Tabell 5.) och vid olika tidpunkter efter inledd bestrålning (IV., Tabell 6.). RBE-värden mellan 0,34 och 0,72 erhöles för röntgenstrålning 50 kV.

DOSHASTIGHETENS BETYDELSE FÖR TIDIGA STRÅLEFFEKTER (V.):

Bestrålning skedde vid följande doshastigheter: 0,34 Gy/s, 0,15 Gy/s och 0,05 Gy/s. Variationerna i doshastighet uppnåddes genom att fokus-preparatavståndet ändrades. Röntgenstrålning genererad vid 50 kV användes. Vid samtliga doshastigheter sågs en ökning av den mukociliära aktiviteten (Tabell 1. och V., Figur 1.). Två olika typer av ökning kunde urskiljas speciellt vid de två lägre doshastigheterna, dels en cirka femprocentig ökning inom loppet av bestrålningens första sekunder, dels en kraftigare ökning med 10 - 15 sekunders duration, vilken inträffade efter en ackumulerad dos av 1,02 - 1,25 Gy (V., Tabell 2.). k-värden för den initiala frekvensökningen och för avsnitten med de större ökningarna bestämdes (V., Tabell 1.). k-värdena var genomgående högre vid högre doshastighet.

Diskussion

Flertalet av de metoder som kommit till användning inom den radiobiologiska forskningen har varit behäftade med brist på möjligheter till samtidig bestrålning och registrering av biologiska händelseförlopp. Som en följd därav är de tidiga effecterna av den joniserande strålningen betydligt mindre utredda än de sent uppträdande. Metodiken att under eller omedelbart efter exponering för joniserande strålning, registrera förändringar i cellers fysiologiska aktivitet har tidigare applicerats huvudsakligen på nerv- och muskelvävnader (GARCIA et coll. 1963, COOPER & KIMELDORF 1966, LEVY 1967, med flera). Resultaten från dylika undersökningar antyder att ändringar i cellernas fysiologiska aktivitet snabbt inträder vid exponering för joniserande strålning men att de stråldoser som kräves för detta varierar avsevärt. Det finns därför anledning att ytterligare försöka kartlägga de tidiga effekterna under bestrålning. För detta ändamål har trakealslemhinnan befunnits vara synnerligen lämpad. Dess fysiologi är välkänd genom undersökningar av HÅKANSSON & TOREMALM (1965 - 1968). Ciliernas morfologi och fysiologi har därtill varit föremål för omfattande undersökningar (WARNER 1974, HIRAMOTO 1974, SATIR 1974). Viktigt att betona från dessa arbeten är att adenosintrifosfat (ATP) anses vara ciliernas energikälla vilket även påvisats i andra undersökningar (HOFFMANN-BERLING 1955, GIBBONS 1966, BROKAW 1967). FUJIWARA et coll. (1972) visade att den mukociliära aktiviteten i trakealslemhinna från kanin var oförändrad vid observation i försökskammare under tre timmar samt att slemhinnan var ett lämpligt objekt för radiobiologiska försök med en duration ej överstigande denna tid. Ljusreflexmetoden som använts för att registrera cilieverksamheten, har tidigare testats i andra sammanhang då det gällt att undersöka exempelvis temperaturens och luftfuktighetens betydelse för den mukociliära aktiviteten i trakealslemhinna (MERCCKE et coll. 1974, MERCCKE 1975). Metodens användbarhet har genom dessa arbeten kunnat dokumenteras. Såväl trakealslemhinnans normala egenskaper som metodiken att registrera dess aktivitet är således välkända parametrar i det biologiska testsystem som använts i föreliggande arbete.

I de aktuella undersökningarna har det visat sig att den mukociliära aktiviteten ökade under bestrålning i samtliga undersökta preparat utan undantag.

Tidpunkten för ökningens inträdande kunde däremot variera med någon eller några sekunder vid samma doshastighet och strålkvalitet. Detta förhållande förklarar de relativt stora avvikelser i standarddeviationen som redovisats för de sekundvis angivna medelvärdena speciellt under exponeringarnas initiala sekunder.

Det har tidigare iakttagits att joniserande strålning kunde påverka cilier-
nas slagfrekvens (UMEDA 1927, HEINE 1936, FRENCKNER 1939, OGI 1959
och FUJIWARA et coll. 1972). Emellertid har varken orsakerna härtill eller
tidsrelationerna mellan bestrålning och inverkan på cilieaktiviteten närmare
utretts. Med den aktuella metodiken har det kunnat visas att en mätbar ök-
ning av vågrörelsefrekvensen i slemhinnan äger rum redan under de fem
första sekunderna av exponeringen. Eftersom man från andra undersökningar
känner till att ATP-koncentrationen kring ciliernas axoneme är av avgörande
betydelse för ciliernas slagfrekvens (SATIR 1974), är det rimligt att antaga
att den joniserande strålningen initialt verkar genom att förändra ATP-kon-
centrationen. Tänkbara mekanismer bakom detta är att strålningen antingen
underlättar för ATP att komma i kontakt med dynein-molekylerna på cilier-
nas mikrotubuli eller att ATP-koncentrationen ökar genom ett ändrat "ut-
flöde" från mitokondrierna. Gemensam nämnare för dessa båda mekanis-
mer är en membranpåverkan ledande till ändrade permeabilitetsförhållanden.
Det är tidigare beskrivet att joniserande strålning påverkar membraners
morfologi och funktion (WILLS 1966, FLEMMING et coll. 1968, HARRIS
1970, WALLACH 1974). Det är genom dessa arbeten också känt att mem-
branförändringarna uppträder snabbt efter bestrålningen. Resultaten från de
aktuella undersökningarna antyder däremot att ändringar i membranpermea-
biliteten kan uppkomma betydligt snabbare, inom loppet av sekunder eller
delar av sekunder efter påbörjad bestrålning.

För att ytterligare kunna knyta den framlagda teorin om strålningens
membraneffekter till de erhållna resultaten, företogs elektronmikroskopiska
undersökningar av de bestrålade ciliecellerna vilka fixerades vid olika tid-
punkter efter avslutad bestrålning till varierande doser (III.). Med trans-
missionselektronmikroskopi var det möjligt att påvisa uttalade skador på
mitokondriemembranerna efter 30 Gy, det vill säga omkring 120 sekunder
efter bestrålningens inledande. Rimligen är dessa membranskador av sådan
omfattning att permeabiliteten inte kan förbli opåverkad då membranstruk-
turen förefaller helt destruerad. Fynden stödes av resultat från andra under-
sökningar (HALL et coll. 1963, BRAUN 1967, GOLDFEDER & SELIG 1969,
de REY & CABRINI 1973), som samtliga rapporterar mitokondrieskador efter
bestrålning. Det finns å andra sidan också undersökningar där man ej kunnat
påvisa mitokondriemembranskador trots höga doser (200 Gy) (COHAN et coll.

1973), eller där betydligt högre doser krävts för membranskador än vad som givits i de aktuella försöken (BERGEDER 1961, BERGEDER 1961). Påpekas bör att det i de refererade undersökningarna ej rört sig om mitokondrier från cilieceller. Den påtalade diskrepansen mellan de aktuella fynden och de refererade torde till en del kunna förklaras av att man använt olika metoder med varierande förmåga att påvisa membranskador. Därtill kan också läggas möjligheten av att det existerar skillnader i vulnerabilitet hos mitokondrier från olika celltyper. I linje med den hypotes som framlagts på grundval av de aktuella resultaten, torde man kunna antaga att mycket låga doser, mindre än 1 Gy, är kapabla att ge membranskador tillräckliga för att uppfattas med en metod som mäter ändringar i cellens fysiologiska aktivitet. Å andra sidan är det uppenbart att stråldoser över 30 Gy kräves för att så omfattande membranskador skall uppstå att de kan upptäckas med nuvarande morfologiska undersökningsmetoder.

Vid samtliga röntgenbestrålningar visade den huvudsakliga ökningen av cilieaktiviteten en begränsad duration. Därtill kan läggas att någon ökning av den mukociliära aktiviteten över huvud taget ej kunde spåras vid rebestrålning av trakealpreparaten. Dessa förhållanden talar för att membranpåverkan i mitokondrierna och det därav beroende "ATP-utflödet" dominerar skeendena under den initiala fasen av bestrålningen. Fynden vid rebestrålningen antyder också att någon nyproduktion av betydelse ej äger rum inom de två timmar som förlöpte mellan första bestrålningen och rebestrålningen. Detta kan uppfattas som ett uttryck för att ATP-syntesen är en påtagligt radiosensibel process, vilket även framhållits av bland andra KLOUWEN et coll. (1963). Eftersom mitokondriemembranerna uppenbarligen allvarligt skadas, borde man förvänta sig en inhiberad ATP-syntes emedan denna sker just i mitokondriernas innermembran (ERNSTER 1975). Emellertid fann BILLEN et coll. (1953) ingen påverkan på ATP-syntesen hos *Escherichia coli* trots bestrålning till höga doser (60 000 R). Det bör i detta sammanhang påpekas att aeroba bakterier saknar mitokondrier och att ATP-syntesen anses ske i cellmembranen (ERNSTER 1975). BILLEN et coll. (1953) fann dock vid samma undersökning ökat ATP-läckage tydande på en allvarlig membran-skada efter bestrålning.

Förändringar i membranpermeabilitet efter bestrålning har också studerats med andra metoder. WILLS & WILKINSON (1967) analyserade lipoperoxidproduktionen hos bland annat mitokondrier efter bestrålning och fann en ökning som dock var mindre än för andra cellorganeller. Denna ökning kan vara tecken på membranskada eftersom det existerar en god korrelation mellan lipoperoxidbildning och svullnad och lys av mitokondrier (HUNTER et coll. 1963). Egna resultat och här citerade från andra arbeten, belyser mem-

branskadornas centrala roll för de initiala strålinducerade effekterna. De aktuella resultaten har visat att den använda metodiken är överlägsen andra metoder när det gäller att tidigt spåra membran effekter.

De svepelektronmikroskopiska undersökningarna visade tydliga förändringar på cilierna efter 40 Gy. Liknande bildningar har beskrivits av andra författare efter inverkan av olika yttre stimuli (STAHLE et coll. 1973, v. MECKLENBURG et coll. 1974). De beskrivna blåsbildningarna har uppfattats som ett ospecifikt reaktionssätt på yttre stimuli (t.ex. hypertermi, laserbestrålning, joniserande strålning) och kan vara tecken på cilielemembranskador. Det har inte varit möjligt att med den använda tekniken värdera i vilken grad dessa förändringar eventuellt påverkar ciliefunktionen. Det kan emellertid ej uteslutas att de innebär en viss funktionsnedsättning, som maskeras vid den första bestrålningen genom ändringarna i ATP-koncentrationen men som visar sig vid rebestrålning i form av en viss minskning av den mukociliära aktiviteten.

Det är ett välkänt fenomen att temperaturen kan påverka de sena effekterna av joniserande strålning (SIMPSON 1916, MARTIN & CALDWELL 1922, HALBERSTÄDTER & SIMONS 1923, HAWKINS & CLARK 1925, MEYER & MUTSCHELLER 1937, EVANS 1941, BARTH & WACHSMANN 1948, BELLI & BONTE 1963, CRILE 1963, CHAMBERLAIN & NORMAN 1966, HALL et coll. 1969, BEN-HUR et coll. 1974, OVERGAARD & OVERGAARD 1974, ROBINSON & WIZENBERG 1974, KIM et coll. 1975, LOSHEK et coll. 1976, STEWART 1976). Inom radioterapi har därför intresset för tumörbehandling under hypertermi åter ökat eftersom åtskilliga av de ovan nämnda undersökningarna dokumenterat en ökad stråleffekt vid hypertermi. Även de tidiga effekterna av joniserande strålning synes vara beroende av temperaturen vilket framgår av resultaten i detta arbete. Däremot framkommer inga tecken på att hypertermi skulle påverka de initiala effekterna såsom fallet är med de sena.

Genom bestämning av storleken på de ytor som begränsades av frekvensökningskurvorna (II., Figur 1.) kunde ett indirekt mått på mängden ATP som utnyttjats av cilierna under bestrålningen erhållas, eftersom man antagit att ATP utgör ciliernas energikälla. De aktuella resultaten visade att betydligt större mängd ATP utnyttjades av cilierna vid 20° C och 30° C än under bestrålning vid 37° C och 40° C. Detta betyder sannolikt att mängden ATP till ciliernas förfogande varit störst vid de lägre temperaturerna. Baserat på undersökningar av OHYAMA et coll. (1967 och 1974), där en hypotes om stimulering av fosfofruktokinas (FPK) under inverkan av joniserande strålning, ledande till transfosforylering av ATP, framlades, kunde man antaga att en transfosforylering ägt rum i de aktuella försöken. Detta skulle med andra

ord kunna betyda att lika stora mängder ATP frisatts genom bestrålningen vid de olika temperaturerna, men att ATP vid de högre temperaturerna transfosforylerats till fruktos-1,6-difosfat under inverkan av FPK resulterande i reduktion av ciliernas tillgängliga energi. Liksom undersökningarna av OHYAMA et coll., antyder de aktuella resultaten att FPK sannolikt inaktiveras vid 20° C och i viss mån även vid 30° C. YAMADA & OHYAMA (1970) kunde med sin teknik visa att transfosforyleringen började inom några minuter efter avslutad bestrålning men den aktuella metodiken avslöjar att denna process tycks starta redan några sekunder efter inledd bestrålning. OHYAMA et coll. antog att FPK stimulerades av den joniserande strålningen. I vilken utsträckning detta sker kan ej avgöras med den här använda undersökningsmetoden, men en sådan effekt på FPK kan ej heller uteslutas med de erhållna resultaten.

Inverkan på de aktuella resultaten av temperaturberoende viskositetsförändringar i slemmet har övervägts. MERCKE et coll. (1974) visade att den mukociliära aktiviteten ökade med stigande temperatur från 20° C till 40° C. Emellertid följer inte den procentuella aktivitetsökningen vid de olika undersökta temperaturerna ett sådant förlopp som beskrivits av MERCKE et coll., varför eventuella viskositetsförändringar inte tillmätts någon avgörande betydelse i detta sammanhang. De erhållna resultaten från bestrålning vid olika temperaturer stöder sålunda ytterligare den tidigare framlagda teorin om en snabbt insättande frigörelse av mitokondriernas förråd av ATP initialt vid bestrålning.

Vid jämförelse mellan tidiga effekter orsakade av bestrålning med röntgenstrålning genererad vid 50 kV och gammastrålning från ⁶⁰Co, framkommer uttalade skillnader vad gäller frisättning av ATP såväl kvantitativt som tidsmässigt (IV.). En dos av 9,8 Gy med ⁶⁰Co gav sådana resultat att det rimligen kan antagas att nästan dubbelt så mycket ATP frigjorts och konsumerats av cilierna som efter 10 Gy röntgenstrålning (50 kV). Det innebär att den radiobiologiska effekten initialt för röntgenstrålningen endast varit hälften av den för ⁶⁰Co. Detta synsätt har öppnat möjligheter att på gängse vis, genom att beräkna vilka doser som kräves för likartad biologisk effekt, bestämma RBE för exempelvis röntgenstrålningen i förhållande till ⁶⁰Co med avseende på tidiga effekter. Som väntat finner man då att RBE, liksom för sena effekter, varierar beroende på vilket biologiskt kriterium eller vilken tidpunkt efter inledd bestrålning man väljer för beräkningen (IV., Tabell 5., 6.). De föreliggande resultaten visar att RBE för tidiga strålinducerade förändringar såsom de här registrerats, under alla förhållanden starkt skiljer sig från de RBE-värden som är baserade på sena stråleffekter. (UPTON et coll. 1956, STORER et coll. 1957, BARENDSEN et coll. 1960,

PATERSON 1960, HALL 1961, SINCLAIR 1962, Report of the RBE Committee 1963, SINCLAIR & KOHN 1964, WAMBERSIE 1967, WAMBERSIE & DUTREIX 1971, de RUITER-BOOTSMA et coll. 1976).

Den tidsmässiga skillnaden mellan ökningen av den mukociliära aktiviteten för ^{60}Co och röntgenstrålningen kan inte förklaras av den obetydliga skillnad i doshastighet som förekom (0,02 Gy/s). Fastmer torde skillnaden vara uttryck för olikheter i biologisk effekt vid olika fotonenergier. Energiabsorptionen domineras av olika processer för de undersökta strålkvaliteterna: för röntgenstrålning (50 kV) fotoelektrisk effekt, för ^{60}Co Comptoneffekt. Eftersom Comptonelektronerna har en betydligt högre energi och längre räckvidd än fotoelektronerna, är det rimligt att antaga att de förra snabbt perforerar membranerna inte bara i de apikalt belägna mitokondrierna utan på grund av den längre räckvidden också skadar ett större antal, djupt ner i cellen liggande, mitokondrier. Detta resonemang kan väl förklara både den snabbare insättande ökningen av cilieaktiviteten och den totalt sett större kvantiteten frisatt ATP vid ^{60}Co -bestrålning kontra röntgenbestrålning. Konklusionen av de aktuella resultaten är att variationer i fotonenergin i sådan utsträckning att energiabsorptionsprocessernas förhållande ändras, medför betydande förändringar av den biologiska effekten initialt. Vidare lämnar det använda testsystemet utmärkta möjligheter att studera huruvida de biologiska effekterna skiljer sig vid pulsad och icke pulsad bestrålning med högenenergetiska strålkvaliteter.

Doshastighetens betydelse för effekterna av joniserande strålning har ägnats stor uppmärksamhet inom både den radiobiologiska forskningen och radioterapi (McWHIRTER 1936, ELLIS 1944, FAIRCHILD 1944, GRAY 1944, SCHÖTTELNDREYER 1949, STEARNER 1951, THOMSON & TOURTELLOTTE 1953, HUNTER et coll. 1957, MOLE 1957, FOWLER & LAWREY 1960, FOWLER & STERN 1960). Det har därför varit naturligt att i det aktuella testsystemet analysera hur de initiala stråleffekterna influeras av ändringar i doshastigheten. Tidigare undersökningar som bygger på observation av sena stråleffekter, har visat en mest uttalad doshastighetseffekt inom 1 Gy per minut till 0,1 Gy per timme för låg-LET-strålning (HALL 1972). Vid mycket låga doshastigheter har man visserligen observerat doshastighetsberoende effekter men resultaten influeras sannolikt i det låga doshastighetsområdet av cellcykelrelaterade faktorer (BEDFORD & MITCHELL 1973, FU et coll. 1975). När det gäller de mycket höga doshastigheterna, tusentals Gy per sekund, är det mera tveksamt om det existerar någon doshastighetseffekt. Resultaten från undersökningar på olika kulturer av däggdjursceller och tumörceller är divergerande (TOWN 1967, BERRY et coll. 1969, TODD et coll. 1967, NIAS et coll. 1970, med flera). Däremot föreligger en

klar doshastighetsrelaterad effekt för bakterier bestrålade vid mycket hög doshastighet, vilket förklarats bero på hypoxi på grund av den snabba energidepositionen (EPP et coll. 1968).

De aktuella undersökningarna visade att det krävdes en viss ackumulerad dos (1 - 1,25 Gy) för att en kraftig ökning av den mukociliära aktiviteten skulle äga rum oavsett med vilken doshastighet bestrålningen genomfördes (V., Figur 1., Tabell 2.). Någon signifikant doshastighetseffekt kan inte anses föreligga med denna företeelse som kriterium på en dylik effekt, emedan skillnaderna i ackumulerad dos är obetydliga. Fenomenet som sådant kan ha sin förklaring i att fotoelektronerna måste påverka mitokondriemembranerna till en viss grad, som kan stå i relation till doshastigheten, innan membranerna skadas så allvarligt att ett kraftigt ATP-utflöde sker, manifesterande sig i en större ökning av cilieaktiviteten. De k-värden som bestämts för olika faser av ciliernas aktivitetsökning under bestrålning återspeglar däremot en klar tendens som kan korreleras till doshastigheten (V., Tabell 1.). Högre k-värden erhöles genomgående vid högre doshastighet. Detta förhållande är ett uttryck för att ju större energideposition per tidsenhet som kan åstadkommas genom bestrålningen, desto plötsligare inträffar de mera omfattande membranskadorna.

Ett annat intressant fenomen som framkommit vid doshastighetsstudierna, är den mindre ökningen av den mukociliära aktiviteten som kunde ses från bestrålningens första sekunder tills den större aktivitetsförändringen inträffade (V., Figur 1 B., 1 C.). Denna relativt blygsamma ökning har uppfattats bero på mycket snabbt insättande membranpermeabilitetsförändringar genom inverkan av radiolys. Tidigare i denna diskussion har enbart sekundärelektronernas direktinverkan på membranerna framförts som en orsak till permeabilitetsförändringarna. Det är emellertid högst sannolikt att proteiner och lipider i membranerna även påverkas av fria radikaler till den grad att permeabiliteten förändras (WALLACH 1974). Detta är processer som sker oerhört snabbt (HOCHANADEL 1960), varför det stämmer väl att en viss mukociliär aktivitetsökning kunnat registreras redan inom de första sekunderna av bestrålningarna vid de lägre doshastigheterna. Denna "radio-lyseffekt" finns sannolikt även vid bestrålning med 0,34 Gy per sekund respektive ^{60}Co men maskeras där av sekundärelektronernas membranpåverkan som manifesterar sig i den kraftigare ökningen av cilieaktiviteten. Försöken har därmed också visat att det endast kräves små stråldoser för att membranpermeabilitetsförändringar skall uppstå, vilket motsäger resultaten från många tidigare undersökningar.

Sammanfattning

De tidiga effekterna av joniserande strålning har studerats i föreliggande arbete. Detta har möjliggjorts genom att en metod utarbetades för simultan bestrålning och registrering av den mukociliära aktiviteten i trakealepitel från kanin. Från radiobiologisk och radioterapeutisk synpunkt intressanta parametrars betydelse för tidiga strålningseffekter har analyserats.

Undersökningarna visade att ciliecellernas fysiologiska aktivitet ökade inom loppet av sekunder efter bestrålningens inledande. Ökningen var temporär (I.).

Genom elektronmikroskopiska undersökningar av det bestrålade materialet kunde de registrerade fysiologiska förändringarna korreleras till morfologiska avvikelser på subcellulär nivå från normalmaterial. Membranskador kunde påvisas i mitokondrier och cilier efter bestrålning till 30 - 40 Gy (III.).

Den joniserande strålningens tidiga effekter var temperaturberoende, men påverkades däremot ej av hypertermi. Temperaturberoendet antages i första hand orsakas av inaktivering av enzymet fosfofruktokinas vid 20° C och 30° C, men en stimulering av samma enzym betingad av bestrålningen kan bidra till de aktuella fynden (II.).

Två olika fotonenergier undersöktes avseende de tidiga effekterna på ciliecellerna. Gammastrålning från ⁶⁰Co gav upphov till en snabbare insättande och mera omfattande biologisk effekt än röntgenstrålning genererad vid 50 kV. RBE för tidiga effekter beräknades. Värdena avviker starkt från de som baseras på sena stråleffekter (IV.).

Doshastighetens betydelse undersöktes. Klara skillnader i effekter för olika doshastigheter kunde redovisas. Dessa försök gav också värdefulla upplysningar angående mekanismerna bakom de tidiga effekterna av joniserande strålning (V.).

En teori om den joniserande strålningens verkningsätt initialt framföres. Denna bygger på antagandet att den joniserande strålningen mycket snabbt påverkar membransystem, speciellt i mitokondrierna, så att permeabilitetsförhållandena för bland annat ATP förändras. Som en följd därav antages ATP-koncentrationen kring ciliernas mikrotubuli temporärt öka resulterande i stegrad cilieaktivitet, då mitokondriernas ATP-reserver tömmes. Mem-

branpåverkan förutsättes ske dels genom effekter av fria radikaler från radiolys av framför allt vatten dels genom sekundärelektronernas direkträffar på membranerna.

Resultaten i sin helhet talar för att det använda systemet är synnerligen känsligt och därmed lämpat för fortsatt användning inom radiobiologisk och radiofysiologisk forskningsverksamhet. Det ger bland annat möjligheter att belysa vilken betydelse pulsad respektive opulsad bestrålning kan ha för tumörbehandling. Det kan också öppna vägen till undersökningar rörande interaktioner mellan joniserande strålning och olika farmaka såsom cancerkemoterapimedel, vilket ur klinisk synpunkt torde vara värdefullt.

Tabell 1. Procentuell ökning av den mukociliära aktiviteten i trakealslemhinna under bestrålning med röntgenstrålning genererad vid 50 kV och gammastrålning från ^{60}Co olt vid olika temperaturer och doshastigheter.

Typ av bestrålning	Ökning (medelvärden i % $\pm$ SD)									
	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Rtg 50 kV, 0,34 Gy/s, 30° C	8,0 $\pm$ 2,0	11,0 $\pm$ 1,0	7,0 $\pm$ 2,0							
Rtg 50 kV, 0,34 Gy/s, 40° C	9,0 $\pm$ 1,8	9,8 $\pm$ 2,0	9,0 $\pm$ 2,5	7,0 $\pm$ 1,5	4,2 $\pm$ 2,0					
"- , 37° C	7,0 $\pm$ 1,5	9,0 $\pm$ 2,0	9,5 $\pm$ 1,5	7,5 $\pm$ 2,0	4,5 $\pm$ 2,0					
"- , 30° C	10,1 $\pm$ 6,3	16,1 $\pm$ 1,2	14,6 $\pm$ 2,5	10,8 $\pm$ 2,4	7,7 $\pm$ 1,5					
"- , 20° C	14,0 $\pm$ 2,5	17,5 $\pm$ 2,0	16,0 $\pm$ 2,5	11,2 $\pm$ 2,5	7,2 $\pm$ 3,0					
Rtg 50 kV, 0,15 Gy/s, 37° C	5,2 $\pm$ 3,3	15,1 $\pm$ 8,1	20,7 $\pm$ 3,9	14,3 $\pm$ 4,1	11,8 $\pm$ 1,8	9,7 $\pm$ 1,7	7,6 $\pm$ 2,0	6,8 $\pm$ 2,1	7,2 $\pm$ 1,4	7,3 $\pm$ 1,0
"- 0,05 Gy/s, "-	3,5 $\pm$ 1,7	3,7 $\pm$ 1,6	3,2 $\pm$ 1,1	4,5 $\pm$ 2,1	10,5 $\pm$ 5,7	19,4 $\pm$ 5,0	20,2 $\pm$ 3,7	14,1 $\pm$ 2,8	10,2 $\pm$ 2,2	9,0 $\pm$ 1,3
^{60}Co olt, 0,07 Gy/s, 37° C	13,9 $\pm$ 7,8	21,3 $\pm$ 1,7	21,9 $\pm$ 1,5	21,0 $\pm$ 2,1	19,6 $\pm$ 1,8	18,7 $\pm$ 1,2	18,7 $\pm$ 2,2	17,7 $\pm$ 2,0	18,1 $\pm$ 1,4	17,9 $\pm$ 1,6
Rtg 50 kV, 0,15 Gy/s, 37° C										
Bestrålning efter 2 timmar	1,2 $\pm$ 0,9	8,5 $\pm$ 7,2	14,6 $\pm$ 2,0	11,9 $\pm$ 3,2	7,5 $\pm$ 3,1	4,3 $\pm$ 1,4	2,8 $\pm$ 1,9	0,7 $\pm$ 1,1	1,1 $\pm$ 2,1	0,3 $\pm$ 2,7
Rtg 50 kV, 0,15 Gy/s, 37° C										
Rebestrålning efter 2 timmar	-3,3 $\pm$ 1,9	-5,9 $\pm$ 2,2	-7,6 $\pm$ 1,6	-6,8 $\pm$ 1,6	-7,0 $\pm$ 1,5	-6,6 $\pm$ 1,8	-5,4 $\pm$ 1,4	-4,9 $\pm$ 1,6	-5,0 $\pm$ 1,4	-3,6 $\pm$ 1,7

Litteraturförteckning

- BALDETORP L.: Effects of re-irradiation on ciliated cells. To be published.
- BARENDSEN G., BEUSKER T.L.J., VERGROESEN A.J., BUDKE L.:
Effects of different ionizing radiations on human cells in tissue culture.
II. Biological experiments. Radiat. Res. 13 (1960), 841.
- BARTH G. & WACHSMANN F.: Über den Einfluss der Temperatur auf die
Hautreaktion bei Röntgenbestrahlungen. Strahlentherapie 77 (1948), 87.
- BEDFORD J.S. & MITCHELL J.B.: Dose-rate effects in synchronous mammary
cells in culture. Radiat. Res. 54 (1973), 316.
- BELLI J.A. & BONTE F.J.: Influence of temperature on the radiation
response of mammalian cells in tissue culture. Radiat. Res. 18 (1963),
272.
- BEN-HUR E., ELKIND M.M., BRONK B.V.: Thermally enhanced radio-
response of cultured Chinese hamster cells: inhibition of repair of
sublethal damage and enhancement of lethal damage. Radiat. Res. 58
(1974), 38.
- BERGEDER H.D.: Untersuchungen zum Einfluss ionisierender Strahlen auf
Zellmembranen. I. Änderungen von Erregungsabläufen durch Röntgen-
strahlen. Strahlentherapie 114 (1961), 406.
- BERGEDER H.D.: Untersuchungen zum Einfluss ionisierender Strahlen auf
Zellmembranen. II. Änderungen von Membranpotential und Kaliumgehalt
des Muskels unter Einwirkung von Röntgenstrahlen. Strahlentherapie
115 (1961), 90.
- BERRY R.J., HALL E.J., FORSTER D.W., STORR T.H., GOODMAN M.J.:
Survival of mammalian cells exposed to X rays at ultra-high dose-rates.
Brit. J. Radiol. 42 (1969), 102.
- BILLEN D., STREHLER B.L., STAPLETON G.E., BRIGHAM E.: Post-
irradiation release of adenosine triphosphate from *Escherichia coli*.
Arch. Biochem. Biophys. 43 (1953), 1.
- BRAUN H.: Beiträge zur Histologie und Zytologie des bestrahlten Thymus.
Strahlentherapie 133 (1967), 411.
- BROKAW C.J.: Adenosine triphosphate usage by Flagella. Science (Wash.)
156 (1967), 76.

- CHAMBERLAIN C. & NORMAN A.: Effects of heat and radiation on survival of mammalian cells in culture. (Abstract). *Radiat. Res.* 27 (1966), 537.
- COHAN S.L., ABBOTT J.R., CATRAVAS G.N.: The effect of ionizing radiation upon mitochondria of the central nervous system. *J. Neurochem.* 20 (1973), 1555.
- COOPER G.P. & KIMELDORF D.J.: The effect of x-rays on the activity of neurons in the rat olfactory bulb. *Radiat. Res.* 27 (1966), 75.
- CRILE Jr. G.: The effects of heat and radiation on cancers implanted on the feet of mice. *Cancer Res.* 23 (1963), 372.
- ELLIS F.: Dosage-rate in radiotherapy symposium. *Brit. J. Radiol.* 17 (1944), 335.
- EPP E.R., WEISS H., SANTOMASSO A.: The oxygen effect in bacterial cells irradiated with high intensity pulsed electrons. *Radiat. Res.* 34 (1968), 320.
- ERNSTER L.: Mitochondrial bioenergetics: facts and ideas. In: *Biomembranes: Structure and Function*, Volume 35, p.257. Editors G.Gárdos, I. Szász. North-Holland/American Elsevier 1975.
- EVANS T.C.: Effects of roentgen irradiation at low temperature on the skin of young rats. *Amer. J. Roentgenol.* 45 (1941), 888.
- FAIRCHILD G.C.: Dosage-rate in radiotherapy symposium. *Brit. J. Radiol.* 17 (1944), 338.
- FLEMMING K., MEHRISHI J.N., NAPIER J.A.F.: The loss of intracellular K^+ ions from the intact Ehrlich ascites carcinoma cell following irradiation with 15 MeV electrons and X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 14 (1968), 175.
- FOWLER J.F. & LAWREY J.M.: Dose-rate effects on mice and rats in the range 2 to 340 rads/minute. *Brit. J. Radiol.* 33 (1960), 382.
- FOWLER J.F. & STERN B.E.: Dose-rate effects: Some theoretical and practical considerations. *Brit. J. Radiol.* 33 (1960), 389.
- FRENCKNER P.: The effect of Roentgen and Radium radiation upon the action of cilia within the respiratory tract. *Acta Otolaryng.* 27 (1939), 297.
- FU K.K., PHILLIPS T.L., KANE L.J., SMITH V.: Tumor and normal tissue response to irradiation in vivo: Variation with decreasing dose rates. *Radiology* 114 (1975), 709.
- FUJIWARA K., HÅKANSSON C.H., TOREMALM N.G.: Influence of ionizing radiation on ciliary cell activity in the respiratory tract. *Acta radiol. Ther. Phys. Biol.* 11 (1972), 513.
- GARCIA J., BUCHWALD N.A., BACH-Y-RITA G., FEDER B.H., KOELLING R.A.: Electroencephalographic responses to ionizing radiation. *Science (Wash.)* 140 (1963), 289.

- GIBBONS I.R.: Studies on the adenosine triphosphate activity of 14 S and 30 S dynein from cilia of *Tetrahymena*. *J. Biol. Chem.* 241 (1966), 5590.
- GOLDFEDER A. & SELIG J.N.: Radiosensitivity and biological properties of tumors. XIV. Correlation between mitochondrial structure, oxidative metabolism, and radiosensitivity. *Radiat. Res.* 37 (1969), 499.
- GRAY L.H.: Dosage-rate in radiotherapy symposium. *Brit. J. Radiol.* 17 (1944), 327.
- HALBERSTÄDTER L. & SIMONS A.: Über Steigerung der Röntgenstrahlenwirkung. *Ergebnisse aus Versuchen an der menschlichen Haut. Strahlentherapie* 15 (1923), 65.
- HALL E.J.: The relative biological efficiency of X rays generated at 220 kVp and gamma radiation from a Cobalt 60 therapy unit. *Brit. J. Radiol.* 34 (1961), 313.
- HALL E.J.: Radiation dose-rate: a factor of importance in radiobiology and radiotherapy. *Brit. J. Radiol.* 45 (1972), 81.
- HALL J.C., GOLDSTEIN A.L., SONNENBLICK B.P.: Recovery of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria after whole body irradiation. *J. Biol. Chem.* 238 (1963), 1137.
- HALL D.R., LEWIS J.D., TOWN C.D., FISH P.J., LINDOP P.J.: Radiation response of HeLa cells exposed at very low temperatures. *Int. J. Radiat. Biol.* 16 (1969), 43.
- HARRIS J.W.: Effects of ionizing radiation on lysosomes and other intracellular membranes. In: *Advances in biological and medical physics*, Volume 13, p. 273. Editors J.H. Lawrence and J.W. Gofman. Academic Press, New York and London 1970.
- HAWKINS J.A. & CLARK H.: Skin reaction to simultaneous treatments with radiant heat and soft X-rays. *J. Exp. Med.* 41 (1925), 761.
- HEINE L.H.: The effect of radiation upon ciliated epithelium. *Ann. Otol.* 45 (1936), 60.
- HIRAMOTO Y.: Mechanics of ciliary movement. In: *Cilia and Flagella*, p. 177. Editor M.A. Sleight. Academic Press, London and New York 1974.
- HOCHANADEL C.J.: Radiation chemistry of water. In: *Comparative effects of radiation*, p. 151. Editors M. Burton, J.S. Kirby-Smith and J.L. Magee. John Wiley & Sons Inc. Publ. New York and London 1960.
- HOFFMANN-BERLING H.: Geisselmodelle und Adenosintriphosphat (ATP). *Biochim. Biophys. Acta* 16 (1955), 146.
- HUNTER C.G., MUNSON R.J., BROWN W.M.C., ABBATT J.D.: The general radiation syndrome: Initial reaction in the monkey. *Nature* 180 (1957), 1466.

- HUNTER Jr. F.E., GEBICKI J.M., HOFFSTEN P.E., WEINSTEIN J., SCOTT A.: Swelling and lysis of rat liver mitochondria induced by ferrous ions. *J. Biol. Chem.* 238 (1963), 828.
- HÅKANSSON C.H. & TOREMALM N.G.: Studies on the physiology of the trachea. I. Ciliary activity indirectly recorded by a new "light beam reflex" method. *Ann. Otol. (St. Louis)* 74 (1965), 954.
- HÅKANSSON C.H. & TOREMALM N.G.: Studies on the physiology of the trachea. II. Electrical potential gradients within the tracheal wall. *Ann. Otol. (St. Louis)* 75 (1966), 33.
- HÅKANSSON C.H. & TOREMALM N.G.: Studies on the physiology of the trachea. III. Electrical activity of the ciliary cell layer. *Ann. Otol. (St. Louis)* 75 (1966), 1007.
- HÅKANSSON C.H. & TOREMALM N.G.: Studies on the physiology of the trachea. IV. Electrical and mechanical activity of the smooth muscles. *Ann. Otol. (St. Louis)* 76 (1967), 873.
- HÅKANSSON C.H. & TOREMALM N.G.: Studies on the physiology of the trachea. V. Histology and mechanical activity of the smooth muscles. *Ann. Otol. (St. Louis)* 77 (1968), 255.
- KIM S.H., KIM J.H., HAHN E.W.: The radiosensitization of hypoxic tumor cells by hyperthermia. *Radiology* 114 (1975), 727.
- KLOUWEN H.M., BETEL I., APPELMAN A.W.M., REUVERS D.C.: Radiosensitivity of nuclear ATP-synthesis. *Int. J. Radiat. Biol.* 6 (1963), 441.
- LEVY C.K.: Immediate, transient responses to ionizing radiation. In: *Current topics in radiation research*, Volume III, p.95. Editors M.Ebert and A.Howard. North Holl. Publ. Co. Amsterdam 1967.
- LOSHEK D.D., ORR J.S., SOLOMONIDIS E.: The interaction of hyperthermia and radiation in CHO cells. *Brit. J. Radiol.* 49 (1976), 805.
- MARTIN C.L. & CALDWELL G.T.: The relation of temperature changes to roentgen-ray skin reactions. *Amer. J. Roentgenol.* 9 (1922), 152.
- McWHIRTER R.: Radiosensitivity in relation to the time intensity factor. *Brit. J. Radiol.* 9 (1936), 287.
- v.MECKLENBURG C., MERCKE U., HÅKANSSON C.H., TOREMALM N.G.: Morphological changes in ciliary cells due to heat exposure. A scanning electron microscopic study. *Cell Tiss. Res.* 148 (1974), 45.
- MERCKE U., HÅKANSSON C.H., TOREMALM N.G.: A method for standardized studies of mucociliary activity. *Acta Otolaryng.* 78 (1974), 118.
- MERCKE U., HÅKANSSON C.H., TOREMALM N.G.: The influence of temperature on mucociliary activity. Temperature range 20° C - 40° C. *Acta Otolaryng.* 78 (1974), 444.

- MERCKE U.: The influence of varying air humidity on mucociliary activity. *Acta Otolaryng.* 79 (1975), 133.
- MEYER W.H. & MUTSCHELLER A.: Heat as a sensitizing agent in radiation therapy of neoplastic diseases. *Radiology* 28 (1937), 215.
- MOLE R.H.: Quantitative observations on recovery from whole body irradiation in mice. *Brit. J. Radiol.* 30 (1957), 40.
- NIAS A.H.W., SWALLOW A.J., KEENE J.P., HODGSON B.W.: Survival of HeLa cells from 10 nanosecond pulses of electrons. *Int. J. Radiat. Biol.* 17 (1970), 595.
- OGI D.: Studies on the cellular effects by radiations. *Nippon Acta radiol.* 19 (1959), 135.
- OHYAMA H., YAMADA T., KUMATORI T., MINAKAMI S.: The effect of X-irradiation on glycolysis of rat thymocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 13 (1967), 457.
- OHYAMA H., YAMADA T., INOUÉ Y.: Effect of post-irradiation temperature on viability of rat thymocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 26 (1974), 535.
- OVERGAARD K. & OVERGAARD J.: Radiation sensitizing effect of heat. *Acta radiol. Ther. Phys. Biol.* 13 (1974), 501.
- PATERSON R.: The relative biological efficiency of 20 MV and 4 MV radiations. *Brit. J. Radiol.* 33 (1960), 271.
- Report of the RBE committee to the international commissions on radiological protection and on radiological units and measurements. *Health Physics* (Pergamon Press) 9 (1963), 357.
- de REY B.M. & CABRINI R.L.: Epidermal changes induced by β -radiation. An ultrastructural study. *J. Submicr. Cytol.* 5 (1973), 157.
- ROBINSON J.E. & WIZENBERG M.J.: Thermal sensitivity and the effect of elevated temperatures on the radiation sensitivity of Chinese hamster cells. *Acta radiol. Ther. Phys. Biol.* 13 (1974), 241.
- de RUITER-BOOTSMA A.L., KRAMER M.F., de ROOIJ D.G., DAVIDS J.A.G.: Response of stem cells in the mouse testis to fission neutrons of 1 MeV mean energy and 300 kV X rays. Methodology, dose-response studies, relative biological effectiveness. *Radiat. Res.* 67 (1976), 56.
- SATIR P.: How cilia move. *Sci. Am.* 231 (1974), 45.
- SCHÖTTELNDREYER H.: Studies of the effect of the protraction of X radiation by 12 fractionations on the erythema reactions. *Brit. J. Radiol.* 22 (1949), 386.
- SIMPSON C.A.: The sensitizing effect of cold on roentgenized surfaces. *Amer. J. Roentgenol.* 3 (1916), 485.
- SINCLAIR W.K.: The relative biological effectiveness of 22-Mevp X-rays, Cobalt-60 gamma rays, and 200 Kvep X-rays. *Radiat. Res.* 16 (1962), 336.

- SINCLAIR W.K. & KOHN H.I.: The relative biological effectiveness of high-energy photons and electrons. *Radiology* 82 (1964), 800.
- STAHL J., ENGSTRÖM B., HÖGBERG L.: Inner ear microsurgery, using lasers. *Adv. Otorhinolaryngol.* 19 (1973), 88.
- STEARNER P.: The effect of variation in dosage rate of roentgen rays on survival in young birds. *Amer. J. Roentgenol.* 65 (1951), 265.
- STEWART F.A.: The effects of combined heat and X rays on mouse skin. *Brit. J. Radiol.* 49 (1976), 808.
- STORER J.B., HARRIS P.S., FURCHNER J.E., LANGHAM W.H.: The relative biological effectiveness of various ionizing radiations in mammalian systems. *Radiat. Res.* 6 (1957), 188.
- THOMSON J.F. & TOURTELLOTTE W.W.: The effect of dose rate on the LD₅₀ of mice exposed to gamma radiation from Cobalt 60 sources. *Amer. J. Roentgenol.* 69 (1953), 826.
- TODD P.W., WINCHELL H.S., FEOLA J.M., JONES G.E.: Inactivation by pulsed high-intensity X-rays of human cells cultured in vitro. *Radiat. Res.* 31 (1967), 644.
- TOREMALM N.G., HÅKANSSON C.H., MERCKE U., DAHLERUS B.: Mucociliary wave pattern. An analysis of surface light reflections. *Acta Otolaryng.* 78 (1974), 247.
- TOWN C.D.: Effect of high dose-rates on survival of mammalian cells. *Nature* 215 (1967), 847.
- UMEDA T.: The action of light, X-ray and radium on the movement of ciliated epithelium (a study in tissue culture method). *Acta derm. (Kyoto)* 10 (1927), 603.
- UPTON A.C., CONTE F.P., HURST G.S., MILLS W.A.: The relative biological effectiveness of fast neutrons, X-rays, and γ -rays for acute lethality in mice. *Radiat. Res.* 4 (1956), 117.
- WALLACH D.F.H.: Radiation effects on biomembranes. In: *Biomembranes*, Volume 5, p.213. Editor L.A.Manson. Plenum Press, New York and London 1974.
- WAMBERSIE A.: Contribution à l'étude de l'efficacité biologique relative des faisceaux de photons et d'électrons de 20 MeV du béta-tron. *J. Belge Radiol. Monographie* 1 (1967), 1.
- WAMBERSIE A. & DUTREIX A.: Problèmes dosimétriques posés par la détermination de l'EBR dans un large domaine d'énergie (électrons de 15 à 34 MeV, photons de 55 kV à 20 MV). In: *Biophysical aspects of radiation quality*, p. 261. Editor IAEA. Vienna 1971.
- WARNER F.D.: The fine structure of the ciliary and flagellar axoneme. In: *Cilia and Flagella*, p.11. Editor M.A.Sleigh. Academic Press. London and New York 1974.

- WILLS E.D.: The effect of irradiation on sub-cellular components. Metal ion transport in mitochondria. *Int. J. Radiat. Biol.* 11 (1966), 517.
- WILLS E.D. & WILKINSON A.E.: The effect of irradiation on lipid peroxide formation in subcellular fractions. *Radiat. Res.* 31 (1967), 732.
- YAMADA T. & OHYAMA H.: Accumulation of fructose-1, 6-diphosphate in X-irradiated rat thymocytes. *Int. J. Radiat. Biol.* 14 (1970), 169.

